家蚕信使核糖核酸的分离及体外活性测定*

ISOLATION OF MESSENGER RNA IN BOMBYX MORI AND IDENTIFICATION OF ITS ACTIVITY IN VITRO

总RNA的制备主要参考Schutz等（1972）的方法，加以修改。除注明外，实验操作控制在4°C以下。以家蚕幼虫的整体（除去消化道）为材料，按1:8（W/V）加入pH8.3缓冲液（0.01M Tris, 0.075M NaCl, 0.005M EDTA, 0.5%SDS），置组织捣碎机中迅速匀浆一分钟。加入4倍组织体积（W/V）90%酚液（9份体积重蒸酚溶于1份体积0.1M Tris溶液中，加入0.1%8-羟基喹啉，pH8.3）及4倍组织体积氯仿—异戊醇（24:1）溶液，在室温中剧烈震荡15分钟，离心，收集上层水相。再于中层及酚氯仿相内加入4倍组织体积pH8.3缓冲液，摇震均匀后离心，收集上层水相。将二次水相液合并，加入0.5倍体积90%酚液及0.5倍体积氯仿-异戊醇，同样震荡、离心，收集上层水相。再重复用酚、氯仿-异戊醇处理，直到无明显蛋白膜为止。收集上层水相，加入固体醋酸钠使达到2%浓度，用2倍体积冷无水乙醇置-20°C使沉淀。离心所得的沉淀溶于生理盐水中（生理盐水体积重量应不超过原组织重量）。再用无水乙醇同样沉淀二次，把最后一次离心收集的沉淀溶解在pH5缓冲液（5mM $MgCl_2$、0.01M醋酸钠）中，加入DNase I（10微克/毫升），0°C消化30分钟。再用冷乙醇反复沉淀三次，获得的精制总RNA溶于生理盐水中进行紫外光吸收测定，检定$\frac{A260}{A230}>2$，$\frac{A280}{A260}<0.5$。用二苯胺法检验DNA为阴性反应。用SPECORD UV VIS分光光度计扫描得到典型的核酸紫外吸收曲线，最高吸收峰为259mμ，最低吸收值在232mμ左右（图1）。

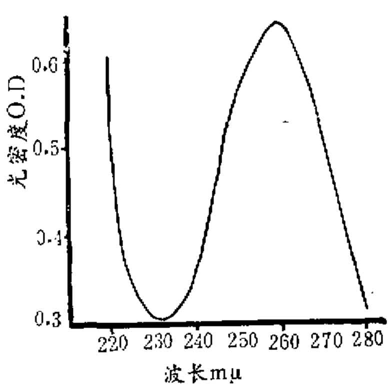


图1　家蚕总RNA紫外吸收光谱

mRNAs的分离

参考Aviv等（1972）的方法，所用器皿、试液都需经过高压灭菌处理。

Oligo (dT) -纤维素处理：将适量oligo (dT) 纤维素置小烧杯中，加入0.5MKCl, 0.01M Tris pH 8.5的缓冲液，搅匀后置冰箱浸泡过夜。然后小心装入夹套柱中，再用该缓冲液滴加淋洗，直至流出液260mμ O. D<0.03时可供RNA上柱用。

*本工作有关活性测定部分，得到中国科学院上海生化所及细胞所的支持和帮助，并承云南省蚕业科学研究所提供家蚕幼虫，特此一并致谢。

本文于1980年4月5日收到。

将制备的总RNA溶解于重蒸馏水中，配成25.O.D/毫升的浓度。离心弃去不溶性物质，吸取上清液，在冰浴条件下，每4毫升上清液中加入0.5毫升2.5M KCl、0.05M Tris pH8.5缓冲液，然后在25°C保温条件下逐步滴加到处理好的Oligo (dT) -纤维素柱中，流速控制在0.4毫升/分，接核酸检测仪检测。样品流完后，用0.5M KCl、0.01M TrispH 8.5缓冲液充分洗脱，至洗脱液260mμ O. D<0.03为止，使不含poly (A) 的RNA直接从柱上流出，含poly (A) 的mRNAs则亲和在柱上。然后用重蒸馏水洗一下柱壁，改用重蒸馏水洗脱mRNAs（图2）。检定所收集的mRNAs，$\frac{A260}{A230}>2$，$\frac{A280}{A260}<0.5$，用紫外分光光度计扫描得到(图3)的特性曲线。含poly(A)的mRNAs的收率为2%左右。

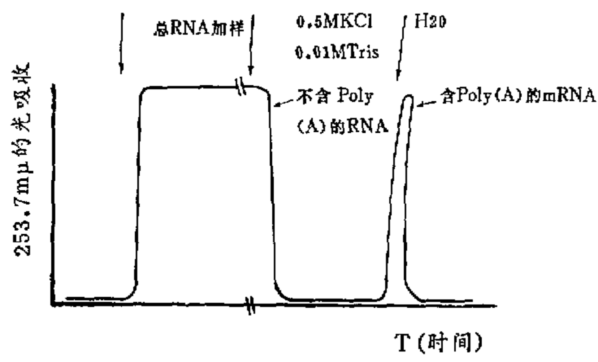


图2 Oligo(dT)-纤维素柱层析记银图

活性测定 我们选用麦胚无细胞蛋白合成系统对mRNAs进行体外活性测定，用家蚕蚁蚕的mRNAs作为样板，经过Sephadex G—25柱脱盐处理后，放在麦胚无细胞蚕白合成系统中进行翻译。以^{3}H-亮氨酸的参入量代表蛋白质的合成量，新合成的蛋白质经三氯醋酸处理使固定在滤纸片上，然后用NE8312液体闪烁仪进行同位素测量，在加入家蚕mRNAs的条件下，麦胚无细胞系统中对^{3}H-亮氨酸参入有明显的刺激作用，促进程度达10倍说明所分离的家蚕mRNAs是具有生物活性的。

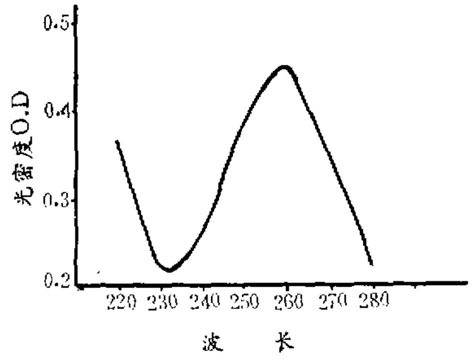


图3 家蚕mRNA紫外吸收光谱

参 考 文 献

中国科学院微生物研究所病毒复制研究组，1976 小麦胚无细胞体系中TMV-RNA指导的氨基酸参入。生物化学与生物物理学报 8 (2)：179—185。

Aviv, H. and P. Leder 1972 Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidylic acid-cellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* 69: 1408—1412.

Roberts, B. E. and Paterson, B. M. 1973 Efficient translation of tobacco mosaic virus RNA and rabbit globin 9s RNA in a cell-free system from commercial wheat germ. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* 70: 2330—2334.

Schutz, G. M. Beato and P. Feigelson 1972 Isolation of eukaryotic messenger RNA on cellulose and its translation in vitro. *Biochem. Biphys. Res. Commu.* 49: 680—689.

胡钧　叶文娟

(中国科学院昆明动物研究所)